

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790555

研究課題名(和文)

核医学検査をもちいたウサギ梗塞心におけるコネクシン発現および除神経領域の観察

研究課題名(英文)

The nuclear medicine study of connexin43 expression and denervation in rabbit heart with myocardial infarction

研究代表者 網野 真理 (MARI AMINO)

東海大学医学部 講師

研究者番号：10407976

研究成果の概要(和文)：

心筋梗塞、心不全などの病態心では心室頻拍・心室細動(VT/VF)などの致命的な不整脈が高率に発生する。我々は心筋核医学の手法を用いてウサギ梗塞心におけるコネクシン43(Cx43)分布異常と¹²³I-metaiodobenzylguanidine(MIBG)との関連を検討した。¹²³I-anti-Cx43 *in vitro* ARGでは、梗塞領域のCx43集積低下に加え、心室中隔においても集積が低下していた。心室中隔にはヒス束およびプルキンエ線維が存在し、これらの主流なギャップ結合はCx40であることから、中隔におけるCx43発現は相対的集積低下を反映した可能性がある。

研究成果の概要(英文)：

Fatal arrhythmia such as ventricular tachycardia and ventricular fibrillation (VT/VF) occurs to a high rate for the condition of a patient with a myocardial infarction or heart failure. We examined the quantification of connexin 43 (Cx43) expressions by using the nuclear medicine techniques in the rabbit infarction model, and investigated the relation between the abnormal Cx43 distribution and the change of the norepinephrine metabolism of the sympathetic nerve ending (functional denervation) using ¹²³I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) nuclear medicine. In the results of ¹²³I-anti-Cx43 *in vitro* ARG, the accumulation of Cx43 decreased at the infarction and neighboring areas which were corresponded to be confirmed by the Cx43 immunostaining, Azan stain, and MIBG exam. In addition the accumulation of Cx43 decreased in the interventricular septum. Because there were bundle of His and Purkinje fibers in the interventricular septum, and this mainstream gap junction was Cx40, therefore the decreased expressions of Cx43 might reflect the relative attenuation. The ¹²³I-anti-Cx43 *in vitro* ARG has a possibility to be effective for an identification of the diseased and physiological distribution of Cx43.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医学系・循環器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞 (MI)、心不全などの病態心では心室頻拍・心室細動 (VT/VF) などの致命的な不整脈が高率に発生する。不整脈の発生にはギャップジャンクション (GJ) 蛋白の分布異常が密接に関与することが知られる。GJ は細胞膜脂質二重層に組み込まれた蛋白 (コネクソン、connexon) の集合体からなり、各コネクソンは 6 個のサブユニット (コネキシン、connexin) で構成される。心房、心室の作業筋にはコネキシン 43 (Cx43) が最も多く、Cx43 の形態学的・機能的なリモデリング機構を防ぐことが突然死予防および治療戦略として重視されるようになった。

病態心では Cx のみならず、交感神経にも形態的・機能的リモデリングが発生することが知られるが、交感神経リモデリングは心筋電気特性に密接に関係し、不整脈を高率に惹起する可能性がある。なぜならば MI において交感神経線維は壊死巣では消失するが、その周辺部分の残存心筋では組織の炎症に伴い治癒期に増生するためである。その結果、局所で生じるノルエピネフリン濃度の不均一な分布を生じ、その結果、活動電位持続時間の不均一性が増大する。交感神経機能についての評価方法は、¹²³I-metaiodobenzyleguanidine (MIBG) 核医学検査が用いられ、洗い出し率、H/M 比などのパラメーターが算出される。しかしながら、MIBG による除神経領域と Cx43 分布の関係について検討を行った報告は無い。

2. 研究の目的

今回我々はウサギ MI モデルにおける心筋核医学的手法を用いた Cx43 の画像定量化を試み、交感神経終末のノルエピネフリン代謝の変化 (機能的除神経) との関連を電気生理学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) モデルの作成

体重 3.5-4.0kg のニュージージーランドホワイト Rabbit を用いて、経皮的頸動脈アプローチ

による冠動脈へのマイクロスフェア (直径 15 μ m、 5.0×10^5 /mL) 注入を行い、心内膜領域を中心とした非貫壁性 MI を作成した (n=5)。MI を作成しないシャムモデルをコントロール群とした (n=5)。非貫壁性 MI モデルでは小梗塞部位を多数形成することでマイクロリエントリーの発生基質を複数点在させることが可能であり、VT/VF 発生率および心臓突然死の危険性は貫壁性 MI よりも高くなる。

(2) 解析

MI 2 週間後、生体位心を用いた実験では、心臓超音波検査 (UCG) で心機能を精査した後、開胸して左室心表面 64 誘導電極マッピングを用いた電気生理学実験 (EPS) を施行した。電極は左室前壁の左前下行枝 (LAD) と左回旋枝 (LCx) 間に設置した。活動時間 (AT) は、QRS の始まりから QRS の最小 dV/dt までの間隔とし、回復時間 (RT) は、QRS の始まりから T 波の最大 dV/dt までの間隔とした。64 電極の中で最も早期の AT を 0ms とした。最初に記録された活動電位と最後に記録された活動電位の電極間の遅延を全体の活動電位時間 (TAT) として評価した。活動電位回復時間 (ARI) は RT から AT をひいた差分から求め、これを局所の再分極の指標とした。また計測エリア内の SD 値を ARI dispersion (ARID) とし再分極のばらつきの評価とした。また興奮伝導の異方性の評価には、64 電極板の上縁中央から BCL200ms で刺激を与え、心筋線維走行に沿った方向: Longitudinal (L) と心筋線維を横切る方向: transverse (T) 方向で等時線を描いて、等時線距離と AT の線形回帰直線から伝導速度 (CV) を算出した。VT/VF の誘発性については、ノルエピネフリン (0.1g/kg/min、i.v.) 注入下でプログラム刺激 (基本周期 200ms S1×5-S2-S3-S4) を行い評価した。

その後、チアミラールナトリウム (10-15mg/kg) を静脈麻酔後、安楽死させ、速やかに心臓を摘出した。心筋を短軸面で厚さ 12-20 μ m のブロック切片とし、一部は線維化同定のため Azan, HE 染色、残りの切片を Cx43 免疫染色、核医学検査に用いた。核医学

検査による Cx43 局在の評価は、マウスモノクローナル抗体を用いたヨウ素 (^{123}I) 標識を施行し SPECT 画像収集を施行した (^{123}I -anti-Cx43 *in vitro* ARG)。

4. 研究成果

MI 後 2 週間で明らかな体重変動はなかった。UCG を用いた左室駆出率 (EF) と短縮率 (FS) は Control に比べて MI で各々 $16 \pm 18\%$ 、 $27 \pm 22\%$ と減少した。また拡張障害 (DT, E/A) についても MI で増悪傾向を示したが、統計学的有意差は生じなかった。

左室表面における 64 誘導電極マッピング実験では、Control における興奮は心室中隔から左室側面に伝導し TAT は 11 ± 3 ms であった。ARIs はほぼ均一で、ARID は 21 ± 11 ms であった。MI では、TAT 33 ± 6 ms と有意に延長し、また ARI の不均一な変化により ARID が 51 ± 12 ms まで増加した。心外膜表面の伝導特性 (CV) について、縦軸 (L) と横軸 (T) で興奮伝導の計測をおこなった。MI では Control と比較して CV_L と CV_T は共に減少した。VT/VF 誘発試験では、プログラム刺激にて Control では VT/VF は誘発されなかったが、MI では全例で VT/VF が誘発された。

心筋病理 Azan, HE 染色では、複数のまだらな小梗塞が左室全体を通して認められ、前壁と下壁の心筋細胞は線維組織に置換されていた (図 1)。残存心筋のなかには代償性肥大を呈している部分も見られた。梗塞の多くは心外膜よりも心内膜に優位に形成されていたが、梗塞部と非梗塞部の混在する虚血境界部も多数存在した。こうした変化は全ての MI モデルで同様の所見が観察された。CSLM オートアナライザーを用いて Azan 染色による心筋横断面のカラー情報を消却し、線維化シグナルを定量化した (図 2)。

MI における Cx43 の免疫染色結果では、前壁と下壁における梗塞領域周囲に Cx43 配列の乱れが認められた (図 3)。梗塞領域の Cx43 配列は一部欠損し、また完全に消失している心筋細胞も見られた。血流が温存されている領域においては GJs のリモデリングが認められた。

核医学検査では、MIBG において除神経領域は梗塞領域に一致して観察され、交感神経

終末のノルエピネフリン代謝減弱が示唆された (機能的除神経)。 ^{123}I -anti-Cx43 *in vitro* ARG では、Cx43 の免疫染色結果で得られた梗塞領域の集積低下に加え、心室中隔においても集積が低下していた (図 4)。中隔のアイソトープ取り込み低下が真に Cx43 の集積を表すか評価するため、 ^{123}I IgG 抗体による ARG を施行した (図 5)。 ^{123}I -anti-Cx43 *in vitro* ARG と ^{123}I -anti-IgG *in vitro* ARG を比較すると、前者は明らかに中隔における Cx43 の集積低下を示すものであることが確認された。心臓の電気伝導系には Cx43 のみならず Cx 分子種の異なる複数のギャップ蛋白が存在する。各種 Cx は発現する組織が異なり、洞房結節は Cx45、心房筋は Cx43, Cx45, Cx40、房室結節は Cx45、ヒス束は Cx40、プルキンエ線維は Cx40, Cx 43、心室筋は Cx43, Cx45 が分布している。心室中隔にはヒス束およびプルキンエ線維が存在し、これらの主流な GJ は Cx40 であることから、今回の検討で示された中隔における Cx43 発現は相対的に減弱した集積低下を反映した可能性がある。 ^{123}I -anti-Cx43 *in vitro* ARG は MI 動物モデルにおける梗塞領域および周辺の Cx43 分布ならびに生理的分布の同定に有効な可能性が示唆された。

図 1)
梗塞心筋における Azan 染色

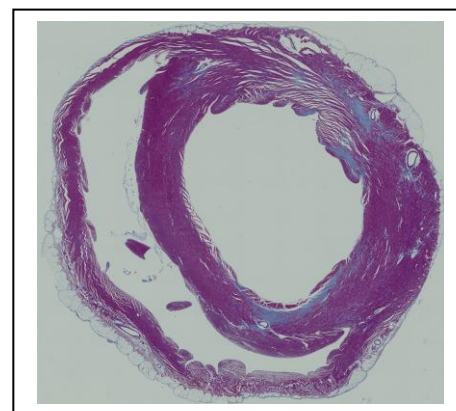


図 2)
梗塞心筋における線維化シグナルの定量化

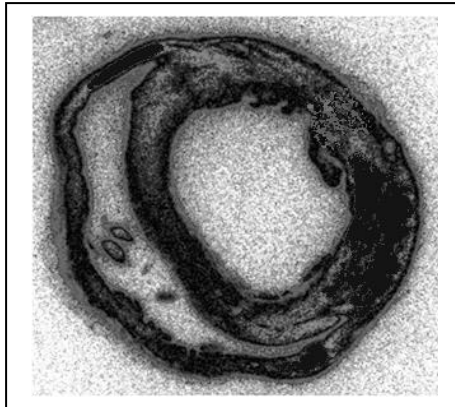
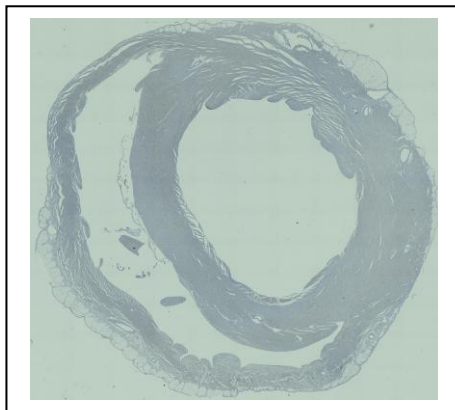
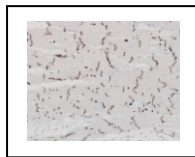


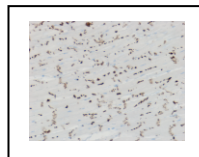
図 3)
梗塞心筋における Cx43 の免疫染色



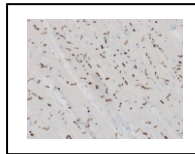
前壁



側壁



下壁



中隔

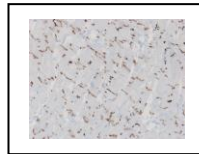


図 4)
[¹²³I]抗 Cx43 抗体による ARG, 48 時間露出後

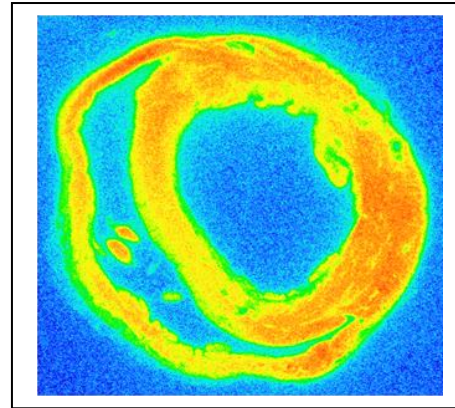
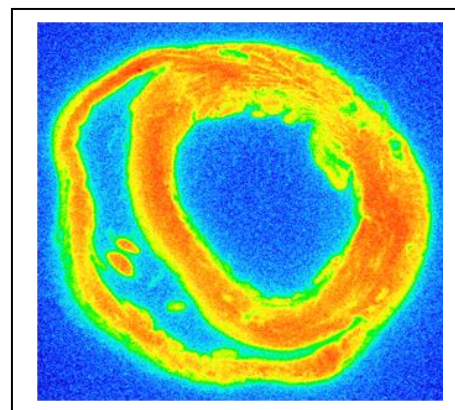


図 5)
[¹²³I]IgG 抗体による ARG, 48 時間露出後



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Amino M, et al. Year-long upregulation of connexin43 in rabbit hearts by heavy ion irradiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 298: H1014-21.

(2) 網野ら, 重粒子線照射による心室ギャップ結合蛋白 (Cx43) 発現亢進と抗不整脈作用. *心電図* Vol.31 No. 2 (2011.04).

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 網野ら, 重粒子線単回照射がウサギ心筋のコネキシン 43 発現に及ぼす長期的効果の検討. *心電図* Suppl.4 PageS-4-164 (2010.09).